

Pruebas de viabilidad *in vitro* de una vacuna viva desarrollada en España frente a la theileriosis mediterránea.

Med Vet 2000; vol. 17 (2): 46-53.

Viseras, J.*; Adroher, F.J.**;
García Fernández, P.*

* Departamento de
Producción Animal, CIFA.
Camino de Purchil, s/n.
18071 Granada. España.

** Departamento de
Parasitología.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.
18071 Granada. España.

RESUMEN

Se han realizado pruebas de viabilidad *in vitro* de una vacuna viva, desarrollada en España, efectiva frente a la theileriosis mediterránea, enfermedad del ganado bovino producida por el protozoo parásito *Theileria annulata*. Los resultados obtenidos con la vacuna refrigerada muestran que ésta es perfectamente viable hasta, al menos, el 4º día post-preparación, formando una monocapa semiconfluyente en 2 semanas o menos. A partir del 6º día post-preparación, hay una reducción progresiva y notable del porcentaje de células vivas que impide la formación de una monocapa celular en dos semanas. Sin embargo, la vacuna congelada mostró siempre (al menos hasta un año post-preparación) un porcentaje de células vivas superior al 80% dando lugar a una monocapa semiconfluyente en menos de 8 días. Estas pruebas *in vitro* fueron completadas posteriormente con la aplicación *in vivo* de la vacuna desarrollada obteniéndose resultados satisfactorios en el proceso de inmunización.

Palabras clave: *Theileria annulata* • Ganado bovino • Vacuna viva • Viabilidad • Pruebas *in vitro* • Inmunización.

INTRODUCCIÓN

Theileria annulata es un protozoo parásito del ganado bovino que es transmitido por garrapatas del género *Hyalomma* (17, 8, 26) causando una enfermedad conocida como theileriosis mediterránea o tropical, que afecta al ganado vacuno de una buena parte de España, llegando a alcanzar prevalencias de más del 90% en algunas provincias para razas tan importantes como el toro de lidia (5, 22). Se pueden alcanzar mortalidades superiores al 70% cuando se trata de razas selectas importadas desde zonas no endémicas que son introducidas en zonas endémicas para esta enfermedad (1).

Desde el primer tercio de siglo XX se vienen registrando casos de theileriosis mediterránea en nuestro país (18, 6) y esto ha seguido ocurriendo hasta nuestros días (4, 5). El tratamiento quimioterápico de la enfermedad es caro y sólo efectivo en aquellos casos en que se detecta la enfermedad a tiempo, ocurriendo en muchas ocasiones bien la muerte del animal tratado, bien el que éste sobreviva sin recuperar su anterior peso y/o su capacidad de producir leche. Sin embargo, existe la posibilidad de desarrollar vacunas vivas frente a este parásito que afecta a una buena parte del ganado de todos los países del litoral mediterráneo (16). El paso previo que se requiere es la atenuación de dicho parásito por



mantenimiento en cultivo *in vitro* durante diferentes períodos de tiempo, dependiendo de la cepa. Esto ha permitido el desarrollo de vacunas efectivas en diversos países desde hace años (12, 11, 7, 13). Pero, en España, no ha sido hasta muy recientemente cuando se ha conseguido aislar y establecer en cultivo *in vitro* el agente etiológico a partir de un caso clínico de theileriosis aguda (23). Ello nos ha permitido desarrollar una vacuna experimental frente a la theileriosis mediterránea que ha sido probada con excelentes resultados (24, 25).

Para que la vacuna sea efectiva, las células inoculadas tienen que estar vivas, mantener su capacidad de establecerse en el animal receptor y ser capaces de transferir los esquizontes que las parasitan a nuevas células del hospedador (20).

En el presente trabajo se lleva a cabo un ensayo *in vitro* para determinar el tiempo que las células, con las que se produce la vacuna viva frente a esta enfermedad, se mantienen viables durante su conservación, bien en condiciones de refrigeración (4 °C), bien congeladas con crioprotectores en nitrógeno líquido (-196 °C).

Posteriormente, tras preparar la vacuna en sus dos modos de conservación, se realiza una aplicación de la misma sobre dos grupos de reses y se observa su respuesta a la inmunización.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivo

Se emplea una línea celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata*, denominada 28E, aislada en Algar, provincia de Cádiz (23), atenuada por pases sucesivos en cultivo *in vitro*. Las células se mantienen en un cultivo en medio RPMI-1640 complementado con un 20% (v/v) de suero bovino fetal inactivado (SBFI) por calor (56 °C durante 30 minutos) creciendo en una monocapa en un frasco de plástico tipo Roux® para cultivo celular y mantenidos en un incubador de CO₂ a 37 °C en una atmósfera húmeda de aire con un 5% de CO₂.

2. Preparación de la vacuna

La vacuna consiste en una suspensión celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* atenuados,

procedentes de un cultivo celular con 70-80 pases. Las células son despegadas de la superficie del frasco de cultivo tratándolas con una solución de EDTA-Na₂ al 0,025% en PBS pH 7,2. La suspensión celular es centrifugada a 400 g durante 10 minutos y el botón celular es resuspendido en medio de cultivo RPMI-1640. Se hace un recuento celular y se ajusta a la concentración necesaria en función de la forma de conservación de la vacuna, refrigerada o congelada (3).

2.1. Vacuna refrigerada

Se prepararon viales de fondo plano de 20 ml de capacidad, conteniendo 10 ml de la suspensión celular en medio RPMI-1640 a una concentración de 10⁶ células/ml. Adicionalmente, se dispensaron cantidades de 10 ml de la suspensión en tubos universales de fondo cónico de 30 ml de capacidad. Todos los viales y tubos fueron conservados a 4 °C.

2.2. Vacuna congelada

La concentración de la suspensión fue ajustada a 10⁷ células/ml en medio RPMI-1640 con 8% (v/v) de dimetil sulfóxido utilizado como crioprotector, distribuyendo 1 ml de la suspensión en cada criotubo. Estos criotubos fueron mantenidos a 4 °C durante 15 minutos, seguidamente a -70 °C durante 24 horas y, finalmente, transferidos y conservados en nitrógeno líquido hasta su uso.

3. Pruebas de viabilidad

Para comprobar la viabilidad celular, se tomó 1 ml de cada uno de los 4 viales de la vacuna refrigerada recién preparada, así como para hacer el seguimiento en el tiempo, se tomó otro ml de cada vial cada día durante los 7 días posteriores a su preparación. Asimismo, se tomaron 0,1 ml de cada uno de 4 criotubos de la vacuna congelada, 2 tras 2 semanas en nitrógeno líquido y otros 2 tras 1 año.

3.1. Tinción vital con azul tripán

Para calcular del porcentaje de células vivas de cada muestra se utilizó la tinción vital de azul tripán (colorante de exclusión) en una cámara hemocitométrica de Neubauer.

3.2. Reestablecimiento celular en cultivo *in vitro*

De cada tubo o vial de vacuna refrigerada, se toma 1 ml de la suspensión celular y se transfiere a un frasco de cultivo celular de 25 cm² de superficie, con 4 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 20% de SBF1 y mantenido a 37 °C en una atmósfera húmeda de aire con un 5% de CO₂. El vial o tubo conteniendo la vacuna refrigerada se lleva de nuevo a 4 °C, repitiéndose todas estas operaciones cada 24 horas, durante los 7 días posteriores a la preparación de la vacuna.

En el caso de vacuna congelada, se extrae un vial del contenedor de nitrógeno líquido y se descongela en las condiciones adecuadas desde -196 °C hasta 37 °C. Una vez descongelado, 0,1 ml de su contenido es rápidamente transferido a un tubo universal de fondo cónico con 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 para diluir la concentración del crioprotector, ya que es tóxico para las células en cultivo. Se centrifuga a 400 g durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante. Se añaden nuevamente 5 ml de medio de cultivo completo en los que se resuspende el botón celular y la suspensión es transferida a un frasco de cultivo e incubada en las mismas condiciones que en el caso anterior.

Los frascos de cultivo inoculados con células procedentes tanto de la vacuna refrigerada como de la vacuna congelada, se observan al microscopio invertido diariamente durante, al menos, dos semanas desde su preparación, al objeto de determinar si hay división celular y crecimiento en monocapa. Para valorar esta capacidad, al tratarse de un parámetro subjetivo, consideramos las siguientes categorías:

- Buena capacidad de crecimiento para el establecimiento del cultivo, con semiconfluencia en menos de 8 días = + + +
- Aceptable capacidad de crecimiento, con semiconfluencia en menos de 10 días = + + -
- Insuficiente capacidad de crecimiento para el establecimiento del cultivo, sin semiconfluencia en dos semanas = + - -.

4. Aplicación de la vacuna

Con posterioridad a estas pruebas *in vitro*, se procedió a la aplicación de las vacunas en sus dos formas de conservación sobre reses de experimentación, para comprobar

si, efectivamente, conservaban su capacidad inmunógena.

4.1. Vacuna refrigerada

Una vez preparados los viales y cerrados herméticamente, fueron transportados, aproximadamente a 4 °C, en una nevera portátil con acumuladores de frío.

Para la administración, se agitaron los viales suavemente para resuspender las células y se tomaron seis dosis de 5 ml con aguja y jeringa estéril que fueron inoculados por vía parenteral subcutánea a sendos animales seleccionados entre los que habían mostrado ser negativos a los análisis previos frente a *T. annulata*.

4.2. Vacuna congelada

Los viales que contienen las dosis ultracongeladas fueron trasladados del contenedor de nitrógeno líquido que se mantiene en la cámara fría del laboratorio a un contenedor de menores dimensiones con el que se hizo el transporte al campo. Dicho contenedor se llenó de nitrógeno líquido hasta completar toda su capacidad después de introducir las ocho dosis que serían inoculadas para el ensayo.

Además, se llevó al campo una bandeja de acero inoxidable que permite ser calentada con llama, una fuente de calor y un termómetro.

Se calentó agua en la bandeja de acero a 37-40 °C manteniendo la temperatura estable en este intervalo. Justo antes de inocular las dosis, se sacaron y se hizo una descongelación rápida al baño María. Seguidamente, cada dosis con un volumen inicial de 1 ml, fue diluida con 4 ml de PBS que en este caso actúa como vehículo y diluyente. Cada dosis preparada de esta manera se administró subcutáneamente, a un grupo de 8 reses de características similares al anterior, en un tiempo que no excedió de 30 minutos desde la descongelación de dichas dosis.

4.3. Seguimiento de la respuesta a la inmunización

Para controlar cuál fue la reacción de las reses a la inmunización con los dos tipos de vacuna utilizada, se realizó un seguimiento que consistió en la observación de la evolución del título de anticuerpos frente a *T. annulata* de todas las reses de ambos grupos, mediante la técnica de inmunofluores-

cencia indirecta (IFI), así como otros parámetros hematológicos y clínicos (11).

Previo a la vacunación se extrajo sangre a cada res con y sin anticoagulante, para la confección de extensiones y obtención de suero con objeto de conocer el estado del animal en el momento de la vacunación, que denominaríamos día 0 y, así mismo, en los días 30, 60, 90 y 120 días postinoculación.

RESULTADOS

La observación del medio de cultivo en los viales que contenían durante el ensayo la vacuna refrigerada, demostró la ausencia de contaminación bacteriana y/o fúngica en el proceso de preparación y conservación de la misma.

Cuando la suspensión celular se conservó refrigerada en tubos de fondo cónico, la tinción con azul tripán y posterior observación al microscopio reveló una mortalidad celular muy alta (> 50%) una vez transcurridas las primeras 24 horas, con una insuficiente capacidad para restablecerse en cultivo (+ - -).

Cuando la vacuna refrigerada fue conservada en viales de fondo plano, el porcentaje de células vivas desde el momento de preparación de la vacuna hasta una semana después, queda reflejado en la Fig. 1 y su capacidad para establecerse en cultivo y dividirse dando lugar a una monocapa celular viene expresada en la Tabla I. En cualquier caso, los resultados fueron ópti-

TABLA I. Capacidad de división de las células que constituyen la vacuna refrigerada, conservada a 4 °C en viales de fondo plano.

Tiempo de conservación (horas)	Capacidad de crecimiento ^a
0	+++
24	+++
48	+++
72	+++
96	+++
120	++-
144	+--
168	+--

^a (+++) Buena capacidad de crecimiento para lograr el establecimiento del cultivo con semiconfluencia en menos de 8 días. (++) Aceptable capacidad de crecimiento con semiconfluencia en menos de 10 días. (+ - -) Insuficiente capacidad de crecimiento para lograr el establecimiento del cultivo, sin semiconfluencia en dos semanas.

mos, al menos, hasta el 4º día posterior a la preparación de esta vacuna.

En las pruebas realizadas sobre la bondad del proceso de congelación y recuperación después de dos semanas y de un año, se determinó un valor medio de células vivas del 88% y 84%, respectivamente, mientras que la capacidad de las mismas para establecerse en cultivo, en todos los casos, se clasificó como buena (+++).

La observación de los animales inoculados condujo a los siguientes resultados:

No se detectaron parásitos en sangre ni en biopsia de ganglios (cuando se practicó).

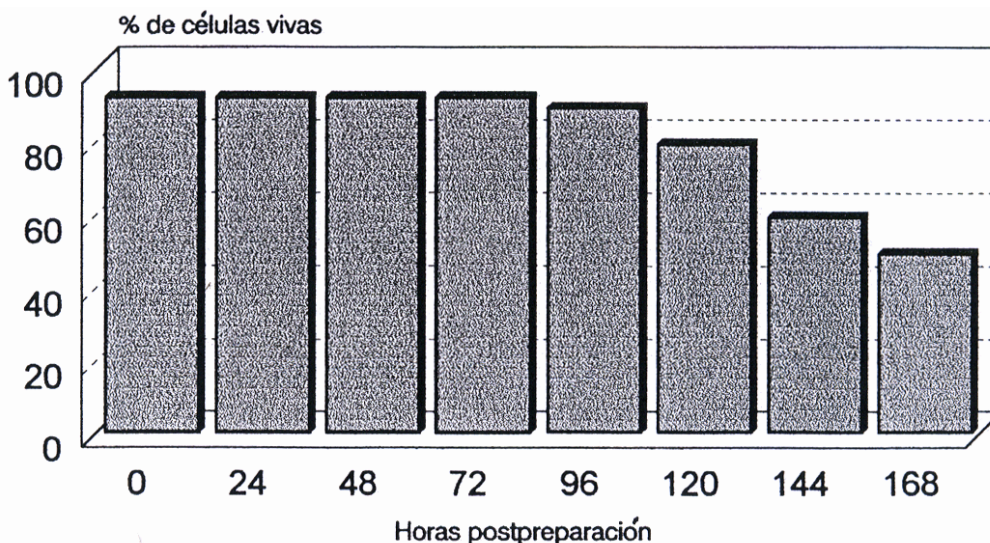


Fig. 1. Porcentaje de células vivas (determinado con azul tripán) en la vacuna refrigerada conservada a 4 °C en viales de fondo plano, en función del tiempo transcurrido desde su preparación.

No se produjo ningún incremento destacable de la temperatura.

El hematocrito se mantuvo en valores normales.

No hubo inflamación de ganglios linfáticos ni ningún otro síntoma clínico específico de los descritos en la literatura (11) que hiciera sospechar alguna reacción adversa postvacunación.

Paralelamente, los animales desarrollaron anticuerpos específicos, frente al antígeno de esquizontes de *T. annulata*, que alcanzaron su concentración máxima, tanto en el caso de vacuna refrigerada como congelada, a los 60 días postvacunación aproximadamente (Fig. 2).

En el grupo de animales inmunizados con vacuna refrigerada, en el día 0 presentaron unos valores medios de título de anticuerpos por debajo de 80 (resultado considerado negativo en esta prueba). Transcurridos 30 días postvacunación, se alcanzaron valores próximos a 320 y a los 60 días, ya se alcanzaron los valores máximos (Fig. 2).

El grupo de reses inmunizadas paralelamente con vacuna congelada tuvo un comportamiento muy similar, como puede observarse en la figura citada.

DISCUSIÓN

Las pruebas de viabilidad *in vitro* se han realizado en base a la demostración de que las células están vivas someténdolas a la tinción de exclusión con azul tripán y comprobando la capacidad que conservan dichas células para establecerse de nuevo en cultivo (13), recuperando su capacidad de división y dando lugar a una monocapa, todo ello después de haber sido preparadas las vacunas y sometidas a un proceso de conservación y almacenamiento. De esta forma, se partió de un porcentaje medio de células vivas en el momento de la preparación de la vacuna del 92% (Fig. 1). Pensamos que este resultado es óptimo ya que en los procesos de extracción y centrifugación siempre se somete al cultivo a un sufri-

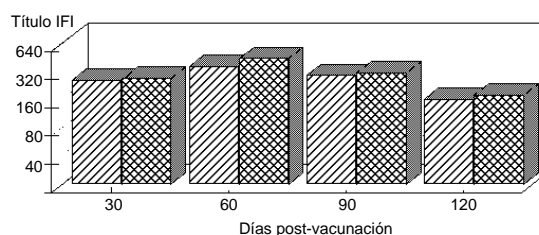
miento que conduce a la pérdida de algunas células, aparte de las que puedan haber muerto de forma natural. En la vacuna refrigerada, este porcentaje de células vivas se mantiene varios días hasta comenzar un ligero descenso (89%) a los 4 días. A partir de los 5 días de su preparación, el descenso en el número de células vivas es progresivo y notable, con lo que se reduce la cantidad de células vivas en el caso de las dosis de vacuna refrigerada. Por otro lado, se observó que la capacidad para establecerse nuevamente en cultivo que tienen estas células es buena durante los 4 primeros días de conservación, mermando progresivamente a partir de este momento y considerándose insuficiente a partir de 6 días post-preparación.

Por estos dos motivos, y teniendo además en cuenta el trabajo de Uilenberg y Pipano (21) –donde se indica que los esquizontes muertos fracasan en la inducción de la inmunidad frente a la theileriosis y que una inmunización efectiva depende del establecimiento de los parásitos en el hospedador–, consideramos que el empleo de la vacuna refrigerada es adecuado desde el momento de la preparación hasta, al menos, 96 horas después (Fig. 1 y Tabla I), con total garantía de su efectividad, no siendo aconsejable su empleo pasados esos cuatro días dada la pérdida de viabilidad de las células que la constituyen. Este resultado coincide con lo publicado por Pipano (13) para vacunas frente a la theileriosis mediterránea en Israel, que considera que la vida práctica de uso de una vacuna recién preparada y mantenida a 4 °C es de 4-5 días, pues la viabilidad de las células infectadas así conservadas desciende drásticamente del 4º al 6º día (del 60% al 30%). Los resultados de las pruebas de esta vacuna también muestran similitud con los de vacunas semejantes producidas frente a la theileriosis ovina producida por *T. hirci*, donde se considera que tienen un tiempo de conservación de 5 días a 4 °C (8).

El hecho de considerar el efecto de la forma del vial en la conservación de la vacuna refrigerada utilizando viales de fondo plano o cónico se ha revelado como crítico en cuanto al mantenimiento de la viabilidad de la vacuna, mostrándose mucho más adecuado el uso de recipientes de fondo plano.

En el caso de la vacuna congelada, ésta puede mantenerse viva en nitrógeno líquido durante años y el que sea efectiva

Fig. 2. Evolución del título de anticuerpos medido por IFI en reses inmunizadas con vacuna refrigerada (//) y reses inmunizadas con vacuna congelada (x).



depende, en buena parte, de haber realizado una criopreservación adecuada y una manipulación correcta en el momento de su descongelación y aplicación en el campo. Los resultados obtenidos indican que, realizando un adecuado proceso de congelación y conservación, la vacuna puede ser usada transcurrido, al menos, un año desde su preparación sin que por ello se vea mermada su viabilidad y, por tanto su eficacia también (13).

En el presente trabajo se han realizado pruebas de viabilidad *in vitro* de una vacuna viva que nos permiten inferir sobre el comportamiento de esta vacuna cuando sea aplicada; no obstante, estos estudios han sido completados con pruebas *in vivo* con reses de ganado vacuno. Estos trabajos nos han proporcionado resultados del comportamiento real de la vacuna *in vivo* después de haber sido preparadas y conservadas en condiciones de congelación y de refrigeración (Fig. 2).

Para valorar la respuesta de los animales al proceso de vacunación, todos los autores consultados coinciden en que un método perfectamente adecuado es medir la evolución del título de anticuerpos de los animales después de la inoculación (15, 2, 10, 19, 24). Además, se realizó el seguimiento de las reses comprobando que no se producían síntomas clínicos de theileriosis, algo fundamental teniendo en cuenta que estamos inoculando una vacuna viva.

Hay que destacar que en ambos grupos de reses vacunadas, la evolución de la respuesta ha sido la típica normal, tanto en el caso en que se ha administrado vacuna

refrigerada como congelada, alcanzándose el máximo título de anticuerpos en un tiempo cercano al segundo mes postvacunación.

En cualquier caso, los resultados ponen de manifiesto que la vacuna refrigerada es perfectamente viable, al menos, hasta los 4 días post-preparación, mientras la vacuna congelada se conserva, al menos, por un año sin pérdida significativa de la viabilidad celular; y atendiendo a lo que aconseja Pipano (13), las vacunas recién preparadas y refrigeradas podrían emplearse en explotaciones ganaderas próximas al lugar de producción de la vacuna, pues la aplicación de campo de este tipo de vacuna requiere sólo un equipo relativamente barato y de poco peso. Las vacunas congeladas, por contra, requieren un equipo más caro, pero permiten un gran radio de acción.

AGRADECIMIENTOS

Queremos mostrar nuestro agradecimiento a D. Francisco Pérez, dueño de las reses sobre las que se aplicó la vacuna en sus dos formas de conservación y al veterinario D. Pedro Arrones por su excelente asistencia técnica en los trabajos de vacunación. Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (I.N.I.A.) por conceder una beca de Formación de Investigadores a J. Viseras, durante el disfrute de la cual ha sido realizado este trabajo, gracias a los fondos concedidos en los proyectos GAN90/0707 de la CICYT y SC98/102 del INIA.

■ SUMMARY

In vitro tests about viability of a live vaccine, developed in Spain, against Mediterranean theileriosis, a cattle disease caused by the protozoan parasite *Theileria annulata*, have been carried out. The results show that chilled vaccine is perfectly viable, at least, until the 4th day post-preparation, and producing a semi-confluent monolayer in less than 2 weeks. Since the 6th day, there was a notable and progressive reduction in the percentage of living cells and, therefore, it did not achieve its establishment in culture producing a cellular monolayer within two weeks. However, frozen vaccine showed always (at least after one year post-preparation) a percentage of cells alive higher than 80%, and producing a semi-confluent monolayer in less than 8 days. Subsequently, these *in vitro* tests were completed by the *in vivo* application of the developed vaccine getting satisfactory results in the immunization process.

Key words: *Theileria annulata* • Cattle • Live vaccine • Viability • *In vitro* tests • Immunization.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown CGD. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia* 1990; 32: 23-31.
2. Dolan TT. Progress in the chemotherapy of theileriosis. En: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. (eds) *Advances in the Control of Theileriosis*, Martinus Nijhoff Publishers, La Haya, 1981, pp. 186-208.
3. FAO. El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 1988, 458 pp.
4. García-Fernández P. Las piroplasmosis del ganado en la Península Ibérica, su importancia económica en la producción animal. II Simposio Ibérico Sobre Ixodoidea y Enfermedades Transmitidas, Evora (Portugal), 1993.
5. García-Fernández P, Hueli LE y Viseras-Alarcón J. Encuesta epizootiológica de la theileriosis bovina por *Theileria annulata* en el toro de lidia. *Med Vet*. 1996; 13: 348-352.
6. García-Rodríguez I. ¿Existe en España theileriosis bovina? *Trab Inst Biolog Anim* 1933; 91-95.
7. Hashemi-Fesharky R. Control of *Theileria annulata* in Iran. *Parasitol Today* 1988; 4: 36-40.
8. Irvin AD. Characterization of species and strains of *Theileria*. *Adv Parasitol* 1987; 26: 145-179.
9. Lawrence JA. Conventional vaccines for tick-borne haemoparasitic diseases of sheep and goats. *Parassitologia* 1997; 39 (2):119-121.
10. Morzaria SP, Irvin AD, Tachara E, Spooner PR, Voigt WP, Fujinaga T, Katende J. Immunization against East Coast fever: the use of cattle exposed to field challenge. *Vet Parasitol* 1987; 23: 23-41.
11. Ouhelli H. Theileriose bovine á *Theileria annulata* (Dschunkowsky y Luhs, 1904). Recherche sur la biologie des vecteurs (*Hyalomma* spp.) et sur les interactions hôte-parasite. Thèse de Doctorat d'Etat, I.N.P. Toulouse, 1985, 190 pp.
12. Ozkoc U y Pipano E. Trials with cell culture vaccine against theileriosis in Turkey. En: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. (eds) *Advances in the Control of Theileriosis*, Martinus Nijhoff Publishers, La Haya, 1981, pp. 256-258.
13. Pipano E. Vaccination against *Theileria annulata* theileriosis. En: Wright, I.G. (ed) *Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines*, C.R.C. Press Inc., Boca Raton, Florida, 1989, pp. 203-234.
14. Pipano E. Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop Anim Hlth Prod* 1997; 29 (4): 86-90.
15. Pipano E, Cahana M. Measurement of the immune response to vaccine from tissue culture of *Theileria annulata* by the fluorescent antibody test. *J Protozool* 1968; 15 (Suppl.): 45.
16. Purnell RE. *Theileria annulata* as a hazard to cattle in countries on the northern Mediterranean littoral. *Vet Sci Commun* 1978; 2: 3-10.
17. Robinson PM. *Theileria annulata* and its transmission. *Trop Anim Hlth Prod* 1982; 14: 3-12.
18. Salvans-Bonet L. Contribución al estudio de piroplasmosis bovinas en España. *Rev Hig San Pec* 1928; 18: 104-108.
19. Subramanian G, Bansal GC, Ray D, Srivastava RVN. Effect of live schizont (*T.*

- annulata*) vaccine in neonatal crossbred bovines. *Ind J Anim Sci* 1989; 58: 9-13.
20. Tait A, Hall FR. *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1990; 9: 387-403.
21. Uilenberg G, Pipano E. *In vitro* studies: appraisal and future perspectives. En: Irvin, A.D., Cunningham, M.P., Young, A.S. (eds) *Advances in the Control of Theileriosis*, Martinus Nijhoff Publishers, La Haya, 1981, pp. 143-147.
22. Viseras J, García-Fernández P, Adroher FJ. La Theileriosis bovina en España y su diagnóstico seroepidemiológico. *Ars Pharm* 1996; 37: 451-461.
23. Viseras J, García-Fernández P y Adroher FJ. Isolation and establishment in *in vitro* culture of a *Theileria annulata*-infected cell line from Spain. *Parasitol Res* 1997a; 83: 394-396.
24. Viseras J, García-Fernández P y Adroher FJ. Field trial of immunization with an experimental vaccine against Mediterranean theileriosis in Spain. *Vet Res* 1997b; 28: 397-403.
25. Viseras J, García-Fernández P y Adroher FJ. Development of an experimental tissue culture vaccine against Mediterranean theileriosis in Spain. *J Vet Med B* 1998; 45: 19-24.
26. Viseras J, Hueli LE, Adroher FJ y García-Fernández P. Studies on the transmission of *Theileria annulata* to cattle by the tick *Hyalomma lusitanicum*. *J Vet Med. B* 1999; 46: 505-509.